

32301W269

PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicants: Mike Farwick, et al.

Serial No.: To Be Assigned

Examiner: Unassigned

Filed: Herewith

Group Art Unit: Unassigned

For: PROCESS FOR THE PREPARATION OF L-AMINO ACIDS
BY USING CORYNEFORM BACTERIA

CLAIM FOR PRIORITY

Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

Under the provisions of 35 U.S.C. § 119, Applicants hereby claim the benefit of the filing date of German Application No. 101 12 992.0, filed on March 17, 2001.

In support of this priority claim, Applicants submit herewith a certified copy of the priority application.

Respectfully submitted,

SMITH, GAMBRELL & RUSSELL, LLP

By:

 32,213 for

Robert G. Weilacher, Reg. No. 20,531
1850 M Street, N.W., Suite 800
Washington, D.C. 20036
Telephone: (202) 659-2811
Facsimile: (202) 263-4329

Dated: March 18, 2002

11002 U.S. PTO
10/098626
03/18/02



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 101 12 992.0
Anmeldetag: 17. März 2001
Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE
Bezeichnung: Verfahren zur fermentativen Herstellung
von L-Aminosäuren unter Verwendung
coryneformer Bakterien
IPC: C 12 N, C 07 H, C 12 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 15. November 2001
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident

Im Auftrag

Sleecy

**Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren
unter Verwendung coryneformer Bakterien**

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, unter Verwendung coryneformer Bakterien, in denen das pfkA-Gen kodierend für die 6-Phosphofruktokinase und/oder das pfkB-Gen kodierend für die 1-Phosphofruktokinase abgeschwächt ist.

Stand der Technik

10 L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, daß Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie zum Beispiel das Lysin-Analogon S-(2-Aminoethyl)-Cystein oder auxotroph für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und L-Aminosäuren produzieren.

- Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung L-Aminosäure produzierender Stämme von *Corynebacterium glutamicum* eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-
5. Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die L-Aminosäure-Produktion untersucht.

Aufgabe der Erfindung

- Die Erfinder haben sich die Aufgabe gestellt, neue Grundlagen für verbesserte Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, mit coryneformen Bakterien bereitzustellen.
- 10

Beschreibung der Erfindung

- Werden im folgenden L-Aminosäuren oder Aminosäuren erwähnt, sind damit eine oder mehrere Aminosäuren einschließlich ihrer Salze, ausgewählt aus der Gruppe L-Asparagin, L-Threonin, L-Serin, L-Glutamat, L-Glycin, L-Alanin, L-Cystein, L-Valin, L-Methionin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Tyrosin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Lysin, L-Tryptophan und L-Arginin gemeint. Besonders bevorzugt ist L-Lysin.
- 15

- 20 Wenn im Folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Basen, sondern sind auch die Salze wie z.B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

- Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen man zumindest die für die 6-Phosphofruktokinase kodierende Nukleotidsequenz und/oder die für die 1-Phosphofruktokinase kodierende Nukleotidsequenz abschwächt, insbesondere ausschaltet oder auf niedrigem Niveau exprimiert.
- 25

- 30 Gegenstand dieser Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren in dem folgende Schritte durchgeführt werden:

- a) Fermentation der L-Aminosäure produzierenden coryneformen Bakterien, in denen zumindest die für die 6-Phosphofruktokinase kodierende Nukleotidsequenz und/oder die für die 1-Phosphofruktokinase kodierende Nukleotidsequenz abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet oder auf niedrigem Niveau exprimiert wird;
- b) Anreicherung der L-Aminosäuren im Medium oder in den Zellen der Bakterien; und
- 10 c) Isolierung der gewünschten L-Aminosäuren, wobei gegebenenfalls Bestandteile der Fermentationsbrühe und/oder der Biomasse in Anteilen oder in ihren Gesamtmengen im Endprodukt verbleiben.

15 Die eingesetzten Stämme produzieren bevorzugt bereits vor der Abschwächung des für die 6-Phosphofruktokinase kodierenden pfkA-Gens und/oder des für die 1-Phosphofruktokinase kodierenden pfkB-Gens L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin.

Bevorzugte Ausführungsformen finden sich in den Ansprüchen.

20 Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

30 Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um

Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung Corynebacterium handeln. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung Corynebacterium, insbesondere der Art Corynebacterium glutamicum, sind besonders die bekannten Wildtypstämme

10 Corynebacterium glutamicum ATCC13032
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870
Corynebacterium melassecola ATCC17965
Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539
Brevibacterium flavum ATCC14067
15 Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende Mutanten bzw. Stämme

wie beispielsweise die L-Lysin produzierenden Stämme

20 Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709
Brevibacterium flavum FERM-P 1708
Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6463
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464 und
25 Corynebacterium glutamicum DSM 5715.

Es wurde gefunden, daß coryneforme Bakterien nach Abschwächung des für die 6-Phosphofruktokinase (EC: 2.7.1.11) kodierenden Gens und/oder des für die 1-Phosphofruktokinase (EC 2.7.1.56) kodierenden Gens in
30 verbesserter Weise L-Aminosäuren produzieren.

Die Nukleotidsequenz des für die 6-Phosphofruktokinase von Corynebacterium glutamicum kodierenden Gens kann der

Patentanmeldung WO 01/00844 unter dem Identification Code RXA00206 als SEQ ID No. 53 entnommen werden.

Die Nukleotidsequenz des für die 1-Phosphofruktokinase von Corynebacterium glutamicum kodierenden Gens kann der
5 Patentanmeldung WO 01/00844 unter dem Identification Code RXA01882 als SEQ ID No. 57 entnommen werden.

Ebenfalls sind die Nukleotidsequenzen in der Genbank unter der Accession Number AX064927 bzw. AX064931 hinterlegt.

Die beanspruchten Nukleotidsequenzen der für die
10 1-Phosphofruktokinase und für die 6-Phosphofruktokinase kodierenden Gene, dargestellt in den SEQ ID No. 3 bzw. SEQ ID No. 1, sind gegenüber den aus dem Stand der Technik bekannten Sequenzen um jeweils bevorzugt bis zu 700 Basenpaare vor dem Startkodon und hinter dem Stopkodon des
15 Gens verlängert.

Die Verlängerungen gegenüber der aus dem Stand der Technik bekannten Sequenz bestehen in der SEQ ID No. 3 aus den Basenpaaren 1 bis 508 bzw. 1684 bis 2234.

In SEQ ID No. 1 bestehen die Verlängerungen gegenüber der
20 aus dem Stand der Technik bekannten Sequenz aus den Basenpaaren 1 bis 531 bzw. 1621 bis 2160.

Die Aminosäuresequenzen der dazugehörigen Genprodukte sind in SEQ ID No. 4 bzw. SEQ ID No. 2 dargestellt.

Es wurde gefunden, daß mit Hilfe der so bereitgestellten
25 verlängerten Sequenzen an sich bekannte Verfahren zur Abschwächung besonders erfolgreich eingesetzt werden können.

Eine solches Verfahren ist die Methode des Genaustausches („gene replacement“). Dabei wird eine Mutation wie z.B.
30 eine Deletion, Insertion oder Basenaustausch in dem interessierenden Gen in-vitro hergestellt. Das hergestellte

Allel wird wiederum in einen für *C. glutamicum* nicht replikativen Vektor kloniert und dieser anschließend durch Transformation oder Konjugation in den gewünschten Wirt von *C. glutamicum* überführt. Nach homologer Rekombination
5 mittels eines ersten, Integration bewirkenden "cross-over"-Ereignisses und eines geeigneten zweiten, eine Exzision bewirkenden "cross-over"-Ereignisses im Zielgen bzw. in der Zielsequenz erreicht man den Einbau der Mutation bzw. des Allels. Diese Methode wurde beispielsweise in EP:
10 00110021.3 verwendet, um das *secG*-Gen von *C. glutamicum* auszuschalten.

Die Verlängerung der eingesetzten Sequenzen ist nicht auf 600 Basenpaare vor dem Startkodon und hinter dem Stopkodon beschränkt. Sie liegt bevorzugt im Bereich von 300 bis 700
15 Basenpaaren, kann aber auch bis zu 800 Basenpaaren betragen. Die Verlängerungen können auch unterschiedliche Mengen an Basenpaaren enthalten.

Die in den angegebenen Textstellen beschriebenen Sequenzen kodierend für die 6-Phosphofruktokinase bzw. 1-
20 Phosphofruktokinase, können erfindungsgemäß verwendet werden. Weiterhin können Allele der 6-Phosphofruktokinase bzw. 1-Phosphofruktokinase verwendet werden, die sich aus der Degeneriertheit des genetischen Codes oder durch funktionsneutrale Sinnmutationen („sense mutations“)
25 ergeben.

Zur Erzielung einer Abschwächung können entweder die Expression des für die 6-Phosphofruktokinase kodierenden Gens und/oder des für die 1-Phosphofruktokinase kodierenden Gens oder die katalytischen Eigenschaften der Genprodukte
30 herabgesetzt oder ausgeschaltet werden. Gegebenenfalls werden beide Maßnahmen kombiniert.

Die Genexpression kann durch geeignete Kulturführung oder durch genetische Veränderung (Mutation) der Signalstrukturen der Genexpression verringert werden.

Signalstrukturen der Genexpression sind beispielsweise Repressorgene, Aktivatorgene, Operatoren, Promotoren, Attenuatoren, Ribosomenbindungsstellen, das Startkodon und Terminatoren. Angaben hierzu findet der Fachmann z.B. in
5 der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Boyd und Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988)), bei Voskuil und Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)), bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191 (1998)), bei Pátek et al. (Microbiology 142: 1297 (1996))
10 und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995) oder dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland,
15 1990).

Mutationen, die zu einer Veränderung bzw. Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften von Enzymproteinen führen, sind aus dem Stand der Technik bekannt; als Beispiele seien die Arbeiten von Qiu und Goodman (Journal of Biological
20 Chemistry 272: 8611-8617 (1997)), Sugimoto et al. (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762 (1997)) und Möckel („Die Threonindehydratase aus Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms“, Berichte des
25 Forschungszentrums Jülichs, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Deutschland, 1994) genannt. Zusammenfassende Darstellungen können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen
30 werden.

Als Mutationen kommen Transitionen, Transversionen, Insertionen und Deletionen in Betracht. In Abhängigkeit von der Wirkung des Aminosäureaustausches auf die Enzymaktivität wird von Fehlsinnmutationen („missense
35 mutations“) oder Nichtsinnmutationen („nonsense mutations“)

gesprochen. Insertionen oder Deletionen von mindestens einem Basenpaar in einem Gen führen zu Rasterverschiebungsmutationen („frame shift mutations“), in deren Folge falsche Aminosäuren eingebaut werden oder die Translation vorzeitig abbricht. Deletionen von mehreren Kodonen führen typischerweise zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität. Anleitungen zur Erzeugung derartiger Mutationen gehören zum Stand der Technik und können bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie wie z.B. dem Lehrbuch von Knippers („Molekulare Genetik“, 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Deutschland, 1995), dem von Winnacker („Gene und Klone“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Deutschland, 1990) oder dem von Hagemann („Allgemeine Genetik“, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986) entnommen werden.

Eine gebräuchliche Methode, Gene von *C. glutamicum* zu mutieren, ist die von Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)) beschriebene Methode der Gen-Unterbrechung („gene disruption“) und des Gen-Austauschs („gene replacement“).

Bei der Methode der Gen-Unterbrechung wird ein zentraler Teil der Kodierregion des interessierenden Gens in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise *E. coli*), nicht aber in *C. glutamicum* replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Simon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), pK18mobsacB oder pK19mobsacB (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174: 5462-65 (1992)), pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA), pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US-Patent 5,487,993), pCR®Blunt (Firma Invitrogen, Groningen, Niederlande; Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) oder pEM1 (Schrumpf et al, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516) in Frage. Der Plasmidvektor, der das

zentrale Teil der Kodierregion des Gens enthält, wird anschließend durch Konjugation oder Transformation in den gewünschten Stamm von *C. glutamicum* überführt. Die Methode der Konjugation ist beispielsweise bei Schäfer et al.

- 5 (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) beschrieben. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Dunican und Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS
10 Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben. Nach homologer Rekombination mittels eines "cross-over"-Ereignisses wird die Kodierregion des betreffenden Gens durch die Vektorsequenz unterbrochen und man erhält zwei unvollständige Allele, denen jeweils das 3'- bzw. das 5'-
15 Ende fehlt. Diese Methode wurde beispielsweise von Fitzpatrick et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)) zur Ausschaltung des *recA*-Gens von *C. glutamicum* verwendet.

- Bei der Methode des Genaustausches („gene replacement“)
20 wird eine Mutation wie z.B. eine Deletion, Insertion oder Basenaustausch in dem interessierenden Gen in-vitro hergestellt. Das hergestellte Allel wird wiederum in einen für *C. glutamicum* nicht replikativen Vektor kloniert und dieser anschließend durch Transformation oder Konjugation
25 in den gewünschten Wirt von *C. glutamicum* überführt. Nach homologer Rekombination mittels eines ersten, Integration bewirkenden "cross-over"-Ereignisses und eines geeigneten zweiten, eine Exzision bewirkenden "cross-over"-Ereignisses im Zielgen bzw. in der Zielsequenz erreicht man den Einbau
30 der Mutation bzw. des Allels. Diese Methode wurde beispielsweise von Peters-Wendisch et al. (Microbiology 144, 915 - 927 (1998)) verwendet, um das *pyc*-Gen von *C. glutamicum* durch eine Deletion auszuschalten.

- In das für die 6-Phosphofruktokinase kodierende Gen
35 und/oder das für die 1-Phosphofruktokinase kodierende Gen

kann auf diese Weise eine Deletion, Insertion oder ein Basenaustausch eingebaut werden.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Aminosäuren vorteilhaft sein, zusätzlich zur Abschwächung des für die
5 6-Phosphofruktokinase kodierenden Gens und/oder des für die
1-Phosphofruktokinase kodierenden Gens, eines oder mehrere
Enzyme des jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der
Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphat-
Zyklus, des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls
10 regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere
überzuexprimieren.

Der Begriff „Verstärkung“ bzw. „Verstärken“ beschreibt in
diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären
Aktivität eines oder mehrerer Enzyme bzw. Proteine in einem
15 Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert
werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens
bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor oder ein Gen
verwendet, das für ein entsprechendes Enzym bzw. Protein
mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese
20 Maßnahmen kombiniert.

So kann für die Herstellung von L-Lysin neben der
Abschwächung des für die 6-Phosphofruktokinase kodierenden
Gens und/oder des für die 1-Phosphofruktokinase kodierenden
Gens eines oder mehrere der Gene ausgewählt aus der Gruppe

- 25 • das für eine feed-back resistente Aspartatkinase
kodierende Gen lysC (Accession No.P26512, EP-B-0387527;
EP-A-0699759; WO 00/63388),
- das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen
dapA (EP-B 0 197 335),
- 30 • das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
kodierende Gen gap (Eikmanns (1992). Journal of
Bacteriology 174:6076-6086),

- gleichzeitig das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen pyc (DE-A-198 31 609),
- das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase kodierende Gen mgo (Molenaar et al., European Journal of Biochemistry 5 254, 395 - 403 (1998)), (Abschwächung oder Verstärkung???)
- das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen zwf (JP-A-09224661),
- gleichzeitig das für den Lysin-Export kodierende Gen lyse (DE-A-195 48 222),
- 10 • das für das Zwal-Protein kodierende Gen zwal (DE: 19959328.0, DSM 13115)
- das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen tpi (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086), und
- 15 • das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen pgk (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),

verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

Weiterhin kann es für die Produktion von Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, vorteilhaft sein, zusätzlich zur
20 Abschwächung des für die 6-Phosphofruktokinase kodierenden Gens und/oder des für die 1-Phosphofruktokinase kodierenden Gens gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende 25 Gen pck (DE 199 50 409.1, DSM 13047),
- das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase kodierende Gen pgi (US 09/396,478, DSM 12969),

- das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB* (DE:1995 1975.7, DSM 13114),
- das für die Fruktose-Bisphosphat Aldolase kodierende Gen *fda* (Mol. Microbiol. 3 (11), 1625-1637 (1989); Genbank
5 Accession Number X17313) und
- das für das Zwa2-Protein kodierende Gen *zwa2* (DE: 19959327.2, DSM 13113)

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

- 10 Schließlich kann es für die Produktion von Aminosäuren, vorteilhaft sein, neben der Abschwächung des für die 6-Phosphofruktokinase kodierenden Gens und/oder des für die 1-Phosphofruktokinase kodierenden Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing Micro-organisms“, in: Overproduction of
15 Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

- Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren
20 (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Aminosäuren kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel
25 (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

- 30 Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology“, der

American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose,
5 Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe
10 können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat,
15 Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder
20 die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wachstumsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den
25 oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

30 Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie

z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoffhaltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Aminosäuren sind aus dem Stand der Technik bekannt. Die Analyse kann so wie bei Spackman et al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al. (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Die vorliegende Erfindung wird im Folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa AG

5 <120> Verfahren zur fermentativen Herstellung von
L-Aminosäuren unter Verwendung coryneformer Bakterien

<130> 010105 BT

10 <140>
<141>

<160> 4

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2234

<212> DNA

20 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (632)..(1660)

25 <223> pfkA-Gen

<400> 1

cctctaataa gagtcgcccc gataagtttt ttaccgtaa ttattactgg gagtcagata 60

30 ctgcgtaagc aatcgagca ggcgcagcgcg tcacagtaag aactgcaggc cacgcgcca 120

tcttcttggc aagtgggtgg gacaggccaa atgcaccaac gtaggttgcc agcaggccag 180

35 tagctactgc aggacccttc ttttcattcc agcttcgtgc agcaagcgct ccggatgctg 240

ccaatggaat ggtgccagc gggcgaaatgc cggattcacg ggcagtcaac caaccgccga 300

tcaaacctgc tgcgacgacg gtggcagtcg tgacctggga tgcctttttc aatttcattt 360

40 ccatggtgag ccagtctaga gacaaaattt ttccgcgggg gttttcttga tctgatccga 420

caaccaatg ggggcaaaaa tgtgtccgac caaaaattgt gcagcacacc acatgccgcg 480

45 tcggacaatg tcgatttggt aatgaaactg cagctctggc gattaaataa gatggtcaga 540

gacagttttt tggcctgtca acccctgtga ttctcttatt tttgggtgat tgttccggcg 600

cgggtgttgt gatgggttta atatggaaga c atg cga att gct act ctc acg 652

Met Arg Ile Ala Thr Leu Thr

50

1

5

tca ggc ggc gac tgc ccc gga cta aac gcc gtc atc cga gga atc gtc 700

Ser Gly Gly Asp Cys Pro Gly Leu Asn Ala Val Ile Arg Gly Ile Val

10

15

20

55

cgc aca gcc agc aat gaa ttt ggc tcc acc gtc gtt ggt tat caa gac 748

Arg Thr Ala Ser Asn Glu Phe Gly Ser Thr Val Val Gly Tyr Gln Asp

25

30

35

	ggt tgg gaa gga ctg tta ggc gat cgt cgc gta cag ctg tat gac gat	796
	Gly Trp Glu Gly Leu Leu Gly Asp Arg Arg Val Gln Leu Tyr Asp Asp	
	40 45 50 55	
5	gaa gat att gac cga atc ctc ctt cga ggc ggc acc att ttg ggc act	844
	Glu Asp Ile Asp Arg Ile Leu Leu Arg Gly Gly Thr Ile Leu Gly Thr	
	60 65 70	
10	ggt cgc ctc cat ccg gac aag ttt aag gcc gga att gat cag att aag	892
	Gly Arg Leu His Pro Asp Lys Phe Lys Ala Gly Ile Asp Gln Ile Lys	
	75 80 85	
15	gcc aac tta gaa gac gcc ggc atc gat gcc ctt atc cca atc ggt ggc	940
	Ala Asn Leu Glu Asp Ala Gly Ile Asp Ala Leu Ile Pro Ile Gly Gly	
	90 95 100	
	gaa gga acc ctg aag ggt gcc aag tgg ctg tct gat aac ggt atc cct	988
	Glu Gly Thr Leu Lys Gly Ala Lys Trp Leu Ser Asp Asn Gly Ile Pro	
	105 110 115	
20	ggt gtc ggt gtc cca aag acc att gac aat gac gtg aat ggc act gac	1036
	Val Val Gly Val Pro Lys Thr Ile Asp Asn Asp Val Asn Gly Thr Asp	
	120 125 130 135	
25	ttc acc ttc ggt ttc gat act gct gtg gca gtg gct acc gac gct gtt	1084
	Phe Thr Phe Gly Phe Asp Thr Ala Val Ala Thr Asp Ala Val	
	140 145 150	
30	gac cgc ctg cac acc acc gct gaa tct cac aac cgt gtg atg atc gtg	1132
	Asp Arg Leu His Thr Thr Ala Glu Ser His Asn Arg Val Met Ile Val	
	155 160 165	
35	gag gtc atg ggc cgc cac gtg ggt tgg att gct ctg cac gca ggt atg	1180
	Glu Val Met Gly Arg His Val Gly Trp Ile Ala Leu His Ala Gly Met	
	170 175 180	
40	gcc ggc ggt gct cac tac acc gtt att cca gaa gta cct ttc gat att	1228
	Ala Gly Gly Ala His Tyr Thr Val Ile Pro Glu Val Pro Phe Asp Ile	
	185 190 195	
45	gca gag atc tgc aag gcg atg gaa cgt cgc ttc cag atg ggc gag aag	1276
	Ala Glu Ile Cys Lys Ala Met Glu Arg Arg Phe Gln Met Gly Glu Lys	
	200 205 210 215	
50	tac ggc att atc gtc gtt gcg gaa ggt gcg ttg cca cgc gaa ggc acc	1324
	Tyr Gly Ile Ile Val Val Ala Glu Gly Ala Leu Pro Arg Glu Gly Thr	
	220 225 230	
55	atg gag ctt cgt gaa ggc cac att gac cag ttc ggt cac aag acc ttc	1372
	Met Glu Leu Arg Glu Gly His Ile Asp Gln Phe Gly His Lys Thr Phe	
	235 240 245	
60	acg gga att gga cag cag atc gct gat gag atc cac gtg cgc ctc ggc	1420
	Thr Gly Ile Gly Gln Gln Ile Ala Asp Glu Ile His Val Arg Leu Gly	
	250 255 260	
65	cac gat gtt cgt acg acc gtt ctt ggc cac att caa cgt ggt gga acc	1468
	His Asp Val Arg Thr Thr Val Leu Gly His Ile Gln Arg Gly Gly Thr	
	265 270 275	

cca act gct ttc gac cgt gtt ctg gcc act cgt tat ggt gtt cgt gca 1516
 Pro Thr Ala Phe Asp Arg Val Leu Ala Thr Arg Tyr Gly Val Arg Ala
 280 285 290 295

5 gct cgt gcg tgc cat gag gga agc ttt gac aag gtt gtt gct ttg aag 1564
 Ala Arg Ala Cys His Glu Gly Ser Phe Asp Lys Val Val Ala Leu Lys
 300 305 310

10 ggt gag agc att gag atg atc acc ttt gaa gaa gca gtc gga acc ttg 1612
 Gly Glu Ser Ile Glu Met Ile Thr Phe Glu Glu Ala Val Gly Thr Leu
 315 320 325

15 aag gaa gtt cca ttc gaa cgc tgg gtt act gcc cag gca atg ttt gga 1660
 Lys Glu Val Pro Phe Glu Arg Trp Val Thr Ala Gln Ala Met Phe Gly
 330 335 340

tagtttttcg ggctttttatc aacagccaat aacagctctt tcgcccattg aggtggaggg 1720

20 gctgtttttt catgccgtaa ggaaagtgca agtaagtga atcaagtggc ctatatccat 1780
 tgacacttag actgtgacct aggccttgact ttcgtggggg agtggggata agttcatctt 1840

25 aaacacaatg caatcgattg catttacgtt ccttatccca caataggggt accttccaga 1900
 aagttggtga ggagatggct tccgaaacct ccagcccgaa gaagcggggc accacgctca 1960
 aagacatcgc gcaagcaaca cagctttcag tcagcacggt gtcccgggca ttggccaaca 2020

30 acgcgagcat tccggaatcc acacgcatcc gagtgggtga agccgctcaa aagctgaact 2080
 accgtcccaa tgcccaagct cgtgcattgc ggaagtcgag gacagacacc atcgggtgtca 2140
 tcattccaaa cattgagaac ccatatttct cctcactagc agcatcgatt caaaaagctg 2200

35 ctcgtgaagc tggggtgtcc accattttgt ccaa 2234

40 <210> 2
 <211> 343
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

45 <400> 2
 Met Arg Ile Ala Thr Leu Thr Ser Gly Gly Asp Cys Pro Gly Leu Asn
 1 5 10 15

Ala Val Ile Arg Gly Ile Val Arg Thr Ala Ser Asn Glu Phe Gly Ser
 20 25 30

50 Thr Val Val Gly Tyr Gln Asp Gly Trp Glu Gly Leu Leu Gly Asp Arg
 35 40 45

Arg Val Gln Leu Tyr Asp Asp Glu Asp Ile Asp Arg Ile Leu Leu Arg
 50 55 60

55 Gly Gly Thr Ile Leu Gly Thr Gly Arg Leu His Pro Asp Lys Phe Lys
 65 70 75 80

Ala Gly Ile Asp Gln Ile Lys Ala Asn Leu Glu Asp Ala Gly Ile Asp
85 90 95

5 Ala Leu Ile Pro Ile Gly Gly Glu Gly Thr Leu Lys Gly Ala Lys Trp
100 105 110

Leu Ser Asp Asn Gly Ile Pro Val Val Gly Val Pro Lys Thr Ile Asp
115 120 125

10 Asn Asp Val Asn Gly Thr Asp Phe Thr Phe Gly Phe Asp Thr Ala Val
130 135 140

Ala Val Ala Thr Asp Ala Val Asp Arg Leu His Thr Thr Ala Glu Ser
145 150 155 160

15 His Asn Arg Val Met Ile Val Glu Val Met Gly Arg His Val Gly Trp
165 170 175

Ile Ala Leu His Ala Gly Met Ala Gly Gly Ala His Tyr Thr Val Ile
180 185 190

Pro Glu Val Pro Phe Asp Ile Ala Glu Ile Cys Lys Ala Met Glu Arg
195 200 205

25 Arg Phe Gln Met Gly Glu Lys Tyr Gly Ile Ile Val Val Ala Glu Gly
210 215 220

Ala Leu Pro Arg Glu Gly Thr Met Glu Leu Arg Glu Gly His Ile Asp
225 230 235 240

30 Gln Phe Gly His Lys Thr Phe Thr Gly Ile Gly Gln Gln Ile Ala Asp
245 250 255

Glu Ile His Val Arg Leu Gly His Asp Val Arg Thr Thr Val Leu Gly
260 265 270

35 His Ile Gln Arg Gly Gly Thr Pro Thr Ala Phe Asp Arg Val Leu Ala
275 280 285

40 Thr Arg Tyr Gly Val Arg Ala Ala Arg Ala Cys His Glu Gly Ser Phe
290 295 300

Asp Lys Val Val Ala Leu Lys Gly Glu Ser Ile Glu Met Ile Thr Phe
305 310 315 320

45 Glu Glu Ala Val Gly Thr Leu Lys Glu Val Pro Phe Glu Arg Trp Val
325 330 335

Thr Ala Gln Ala Met Phe Gly
340

50

55 <210> 3
<211> 2160
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (609)..(1598)

<223> pfkB-Gen

5 <400> 3
 cccatgggta cgtctccccc tcggttgaaa cctgccttgg ttaaaggaat gccaccggaa 60
 ccccggtgttt tagaacttgc agaaactgca gtttcctca tcacacctct agcacgcagc 120
 10 attttcctgg attcagggttt agcgtgcacg gcgattgccca cgggtgttggg ggatcctcca 180
 gaagatgccca ggtggactgt tgttacaagt tccccggcg ctgtgattgc cttgtccgcg 240
 acagatgccca cctccacggt ggtgctgcac gggcagggttc acggttaattg ttcttcaatc 300
 15 attgggtcca cggcagtaga catgatttcg cagttgcgcg ctgatatcgc cttcgtggag 360
 gttgatgcga ttcaatccga tacaagtctg tgcacgtttt tcccggagac gattcccatc 420
 20 aagcaagcca tgatcaaaaa cgcggctttc acagttgctg ttctcagccc gagatctccc 480
 caagatcaag aacttcaact tttgaagcac cttttttcca ccttggtgta ttttgatgcc 540
 cttgttaccg atgaccacac gctagatttt ccagttttgc ccgaccacaa ctttcagggtg 600
 25 gtaacccc atg atc atc aca ttc acc cca aac ccg agt att gat tcc acg 650
 Met Ile Ile Thr Phe Thr Pro Asn Pro Ser Ile Asp Ser Thr
 1 5 10

30 ctg tcg ctc ggc gaa gag ctc tcc cgt gga tcc gtc caa cga ctt gat 698
 Leu Ser Leu Gly Glu Glu Leu Ser Arg Gly Ser Val Gln Arg Leu Asp
 15 20 25 30

35 tcc gtc acc gct gtc gca ggt ggt aaa ggc atc aat gtc gcc cac gct 746
 Ser Val Thr Ala Val Ala Gly Gly Lys Gly Ile Asn Val Ala His Ala
 35 40 45

40 gtc ttg ctt gcg ggc ttt gaa acc ttg gct gtg ttc cca gcc ggc aag 794
 Val Leu Leu Ala Gly Phe Glu Thr Leu Ala Val Phe Pro Ala Gly Lys
 50 55 60

45 ctc gac ccc ttc gtc cca ctg gtc cgc gac atc ggc ttg ccc gtg gaa 842
 Leu Asp Pro Phe Val Pro Leu Val Arg Asp Ile Gly Leu Pro Val Glu
 65 70 75

50 act gtt gtg atc aac aag aac gtc cgc acc aac acc aca gtc acc gaa 890
 Thr Val Val Ile Asn Lys Asn Val Arg Thr Asn Thr Thr Val Thr Glu
 80 85 90

55 ccg gac ggc acc acc acc aag ctc aac ggc ccc ggc gcg ccg ctc agc 938
 Pro Asp Gly Thr Thr Thr Lys Leu Asn Gly Pro Gly Ala Pro Leu Ser
 95 100 105 110

gag cag aag ctc cgt agc ttg gaa aag gtg ctt atc gac gcg ctc cgc 986
 Glu Gln Lys Leu Arg Ser Leu Glu Lys Val Leu Ile Asp Ala Leu Arg
 115 120 125

ccc gaa gtc acc tgg gtt gtc ctg gcg ggc tcg ctg cca cca ggg gca 1034
 Pro Glu Val Thr Trp Val Val Leu Ala Gly Ser Leu Pro Pro Gly Ala

	130	135	140	
5	cca gtt gac tgg tac gcg cgt ctc acc gcg ttg atc cat tca gca cgc Pro Val Asp Trp Tyr Ala Arg Leu Thr Ala Leu Ile His Ser Ala Arg 145 150 155	1082		
10	cct gac gtt cgc gtg gct gtc gat acc tca gac aag cca ctg atg gcg Pro Asp Val Arg Val Ala Val Asp Thr Ser Asp Lys Pro Leu Met Ala 160 165 170	1130		
15	ttg ggc gag agc ttg gat aca cct ggc gct gct ccg aac ctg att aag Leu Gly Glu Ser Leu Asp Thr Pro Gly Ala Ala Pro Asn Leu Ile Lys 175 180 185	1178		
20	cca aat ggt ctg gaa ctg ggc cag ctg gct aac act gat ggt gaa gag Pro Asn Gly Leu Glu Leu Gly Gln Leu Ala Asn Thr Asp Gly Glu Glu 195 200 205	1226		
25	ctg gag gcg cgt gct gcg caa ggc gat tac gac gcc atc atc gca gct Leu Glu Ala Arg Ala Ala Gln Gly Asp Tyr Asp Ala Ile Ile Ala Ala 210 215 220	1274		
30	gcg gac gta ctg gtt aac cgt ggc atc gaa cag gtg ctt gtc acc ttg Ala Asp Val Leu Val Asn Arg Gly Ile Glu Gln Val Leu Val Thr Leu 225 230 235	1322		
35	ggt gcc gca gga gcg gtg ttg gtc aac gca gaa ggt gcg tgg act gct Gly Ala Ala Gly Ala Val Leu Val Asn Ala Glu Gly Ala Trp Thr Ala 240 245 250	1370		
40	act tct cca aag att gat gtt gta tcc acc gtt gga gct gga gac tgt Thr Ser Pro Lys Ile Asp Val Val Ser Thr Val Gly Ala Gly Asp Cys 255 260 265	1418		
45	gct ctt gca ggt ttt gtt atg gca cgt tcc cag aag aaa aca ctg gag Ala Leu Ala Gly Phe Val Met Ala Arg Ser Gln Lys Lys Thr Leu Glu 275 280 285	1466		
50	gaa tct ctg ctg aat gcc gtg tct tac ggc tcg act gcg gcg tct ctt Glu Ser Leu Leu Asn Ala Val Ser Tyr Gly Ser Thr Ala Ala Ser Leu 290 295 300	1514		
55	cct ggc act acc att cct cgt cct gac caa ctc gcc aca gct ggt gca Pro Gly Thr Thr Ile Pro Arg Pro Asp Gln Leu Ala Thr Ala Gly Ala 305 310 315	1562		
60	acg gtc acc caa gtc aaa gga ttg aaa gaa tca gca tgaatagcgt Thr Val Thr Gln Val Lys Gly Leu Lys Glu Ser Ala 320 325 330	1608		
65	aaataattcc tcgcttgctcc ggctggatgt cgatttcggc gactccacca cggatgtcat caacaacctt gccactgtta ttttcgacgc tggccgagct tcctccgccg acgcccttgc caaagacgcg ctggatcgtg aagcaaagtc cggcaccggc gttcctggtc aagttgctat ccccactgc cgttccgaag ccgtatctgt ccctaccttg ggctttgctc gcctgagcaa gggtgtggac ttcagcggac ctgatggcga tgccaacttg gtgttcctca ttgcagcacc	1668 1728 1788 1848 1908		

tgctggcggc ggcaaagagc acctgaagat cctgtccaag cttgctcgct ccttggtgaa 1968
 gaaggatttc atcaaggctc tgcaggaagc caccaccgag caggaaatcg tcgacgttgt 2028
 5 cgatgccgtg ctcaaccag caccaaaaac caccgagcca gctgcagctc cggctgcggc 2088
 ggcggttgct gagagtgggg cggcgctcgac aagcggttact cgtatcgtgg caatcaccgc 2148
 10 atgccaacc gg 2160

<210> 4
 <211> 330
 15 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

<400> 4
 Met Ile Ile Thr Phe Thr Pro Asn Pro Ser Ile Asp Ser Thr Leu Ser
 20 1 5 10 15
 Leu Gly Glu Glu Leu Ser Arg Gly Ser Val Gln Arg Leu Asp Ser Val
 20 25 30
 25 Thr Ala Val Ala Gly Gly Lys Gly Ile Asn Val Ala His Ala Val Leu
 35 40 45
 Leu Ala Gly Phe Glu Thr Leu Ala Val Phe Pro Ala Gly Lys Leu Asp
 50 55 60
 30 Pro Phe Val Pro Leu Val Arg Asp Ile Gly Leu Pro Val Glu Thr Val
 65 70 75 80
 Val Ile Asn Lys Asn Val Arg Thr Asn Thr Thr Val Thr Glu Pro Asp
 35 85 90 95
 Gly Thr Thr Thr Lys Leu Asn Gly Pro Gly Ala Pro Leu Ser Glu Gln
 100 105 110
 40 Lys Leu Arg Ser Leu Glu Lys Val Leu Ile Asp Ala Leu Arg Pro Glu
 115 120 125
 Val Thr Trp Val Val Leu Ala Gly Ser Leu Pro Pro Gly Ala Pro Val
 130 135 140
 45 Asp Trp Tyr Ala Arg Leu Thr Ala Leu Ile His Ser Ala Arg Pro Asp
 145 150 155 160
 Val Arg Val Ala Val Asp Thr Ser Asp Lys Pro Leu Met Ala Leu Gly
 50 165 170 175
 Glu Ser Leu Asp Thr Pro Gly Ala Ala Pro Asn Leu Ile Lys Pro Asn
 180 185 190
 55 Gly Leu Glu Leu Gly Gln Leu Ala Asn Thr Asp Gly Glu Glu Leu Glu
 195 200 205
 Ala Arg Ala Ala Gln Gly Asp Tyr Asp Ala Ile Ile Ala Ala Ala Asp
 210 215 220

Val Leu Val Asn Arg Gly Ile Glu Gln Val Leu Val Thr Leu Gly Ala
225 230 235 240

5 Ala Gly Ala Val Leu Val Asn Ala Glu Gly Ala Trp Thr Ala Thr Ser
245 250 255

Pro Lys Ile Asp Val Val Ser Thr Val Gly Ala Gly Asp Cys Ala Leu
260 265 270

10 Ala Gly Phe Val Met Ala Arg Ser Gln Lys Lys Thr Leu Glu Glu Ser
275 280 285

15 Leu Leu Asn Ala Val Ser Tyr Gly Ser Thr Ala Ala Ser Leu Pro Gly
290 295 300

Thr Thr Ile Pro Arg Pro Asp Gln Leu Ala Thr Ala Gly Ala Thr Val
305 310 315 320

20 Thr Gln Val Lys Gly Leu Lys Glu Ser Ala
325 330

25

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien,
enthaltend verlängerte für die 1-Phosphofruktokinase
und/oder 6-Phosphofruktokinase kodierende
Polynukleotidsequenzen,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie jeweils vor dem Startkodon und hinter dem
Stopkodon des Gens jeweils um bis zu ca. 700
Basenpaaren verlängert sind.
2. Isoliertes Polynukleotid gemäß Anspruch 1,
enthaltend eine für die 1-Phosphofruktokinase und/oder
6-Phosphofruktokinase kodierende Polynukleotidsequenz,
dadurch gekennzeichnet,
daß sie vor dem Startkodon und hinter dem Stopkodon
des Gens jeweils um bis zu ca. 700 Basenpaare
verlängert sind, wobei die verlängerten
Aminosäuresequenzen für das 1-Phosphofruktokinase-Gen
in SEQ ID No. 3 und für das 6-Phosphofruktokinase-Gen
in SEQ ID No. 1 dargestellt sind und die
Verlängerungen gegenüber den aus dem Stand der Technik
bekannten Sequenzen
in SEQ ID No. 3 aus den Basenpaaren 1 bis 508 bzw.
1684 bis 2234 und in SEQ ID No. 1 aus den Basenpaaren
1 bis 531 bzw. 1621 bis 2160 bestehen.
3. Verfahren zur fermentativen Herstellung von
L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin,
dadurch gekennzeichnet,
daß man folgende Schritte durchführt,
- a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure
produzierenden coryneformen Bakterien, in denen
man zumindest das für die 6-Phosphofruktokinase

kodierende Gen und/oder das für die 1-
Phosphofruktokinase kodierende Gen abschwächt,

b) Anreicherung des gewünschten Produkts im Medium
oder in den Zellen der Bakterien, und

5 c) Isolierung der gewünschten L-Aminosäure, wobei
gegebenenfalls Bestandteile der
Fermentationsbrühe und/oder Biomasse in Anteilen
oder in ihren Gesamtmengen im Endprodukt
verbleiben.

10 4. Verfahren gemäß Anspruch 3,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man coryneforme Bakterien einsetzt, in denen man
die Abschwächung unter Verwendung der
Polynukleotidsequenzen erzielt, die vor dem Startkodon
15 und hinter dem Stopkodon des jeweiligen Gens um
jeweils 300 bis 800 Basenpaare verlängert sind.

5. Verfahren gemäß Anspruch 4,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man coryneforme Bakterien einsetzt, in denen man
20 die Abschwächung unter Verwendung der
Polynukleotidsequenzen erzielt, die vor dem Startkodon
und hinter dem Stopkodon des Gens jeweils um ca. 700
Basenpaare verlängert sind, wobei die verlängerten
Nukleotidsequenzen für das 1-Phosphofruktokinase-Gen
25 in SEQ ID No. 3 und für das 6-Phosphofruktokinase-Gen
in SEQ ID No. 1 dargestellt sind und die
Verlängerungen in SEQ ID No. 3 gegenüber der aus dem
Stand der Technik bekannten Sequenz aus den
Basenpaaren 1 bis 508 bzw. 1684 bis 2234 und
30 in SEQ ID No. 1 gegenüber der aus dem Stand der
Technik bekannten Sequenz aus den Basenpaaren 1 bis
531 bzw. 1621 bis 2160 bestehen.

6. Verfahren gemäß Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich
weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-
Aminosäure verstärkt.
7. Verfahren gemäß Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Bakterien einsetzt, in denen die
Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet
sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure
verringern.
8. Verfahren gemäß Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Expression des (der) Polynukleotides (e),
das (die) für die 6-Phosphofruktokinase und/oder für
die 1-Phosphofruktokinase kodiert (en), verringert.
9. Verfahren gemäß Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die katalytischen Eigenschaften des (der)
Polypeptid(s)e (Enzymprotein(s)e) verringert, für das
das (die) Polynukleotid(e) aus SEQ ID NO.1 bzw.
SEQ ID No. 3 kodieren.
10. Verfahren gemäß Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß man für die Herstellung von L-Lysin coryneforme
Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig
eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 10.1 das für eine feed-back resistente
Aspartatkinase kodierende Gen *lysC*,
- 10.2 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase
kodierende Gen *dapA*,

- 10.3 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat
Dehydrogenase kodierende Gen gap,
- 10.4 das für die Pyruvat Carboxylase kodierende
Gen pyc,
- 5 10.5 das für die Malat:Chinon Oxidoreduktase
kodierende Gen mgo,
- 10.6 das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase
kodierende Gen zwf,
- 10 10.7 gleichzeitig das für den Lysin-Export
kodierende Gen lysE,
- 10.8 das für das Zwal-Protein kodierende Gen zwai
- 10.9 das für die Triosephosphat Isomerase
kodierende Gen tpi, und
- 15 10.10 das für die 3-Phosphoglycerat Kinase
kodierende Gen pgk,

verstärkt insbesondere überexprimiert.

11. Verfahren gemäß Anspruch 3,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme
20 Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig
eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 11.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
kodierende pck-Gen,
- 11.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase
25 kodierende pgi-Gen
- 11.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen poxB,

11.4 das für die Fruktose-Bisphosphat Aldolase
kodierende Gen fda oder

11.5 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2
abschwächt.

5 12. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden
Ansprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man Mikroorganismen der Art Corynebacterium
glutamicum einsetzt.

10 13. Coryneforme Bakterien, in denen zumindest das für die
6-Phosphofruktokinase kodierende Gen und/oder das für
die 1-Phosphofruktokinase kodierende Gen abgeschwächt
vorliegt.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, bei dem man folgende Schritte durchführt:

- 5 a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden coryneforme Bakterien, in denen man zumindest das für die 6-Phosphofruktokinase kodierende Gen und/oder das für die 1-Phosphofruktokinase kodierende Gen abschwächt,
 - 10 b) Anreicherung der gewünschten L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und
 - c) Isolierung der L-Aminosäure,
- und gegebenenfalls Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt, oder Bakterien
- 15 einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.